



(57) 摘要

本发明提供了一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用，该序列如序列表所示，本发明的优点是：通过同源比较，获得一系列与所有已经发表的 HIV 序列高度同源的 RNA 序列片段，使用该系列片段衍生的双链 RNA 序列可以有效地抑制 HIV 基因的表达；使用质粒转录的该系列 RNA 也可在细胞内抑制 HIV 基因的表达；携带该片段对应 DNA 腺病毒伴随病毒感染细胞后可以转录出对应的双链 RNA 并抑制 HIV 基因的表达。

一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用

技术领域

本发明涉及一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用。

5

背景技术

近两年的研究结果证实短的双链 RNA 在多种哺乳动物细胞中具有干扰 RNA 功能，可以特异抑制特定基因在细胞内的表达。通过该途径也可抑制病毒（包括 HIV 病毒）基因在细胞内的表达。但是由于 HIV 病毒具有极大的变异性，目前所使用的 10 序列均只与少数 HIV 株序列同源，因此不能作为普遍有效的基因治疗药物使用。

发明公开

本发明的目的是提供一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列。

本发明的另一个目的是提供上述核苷酸序列的应用。

15 为实现上述发明目的，本发明采用以下技术方案：

一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的 RNA 序列及其片段，该序列及其片段为如下所述的单链 RNA 序列及其片段、或该单链 RNA 序列及其片段与其互补序列及其片段杂交形成的双链 RNA 序列：

- (1) aucaauggaggaaggcugcagaaugg;
- 20 (2) ggaaagugacauagcagggacauacuag;
- (3) uaaaauaaaauaguaagaauguauagccu;
- (4) uauggggguaccugugugga;
- (5) gccaaauucccauacauuuauugugc;
- (6) uuaaauggcagucuagcagaa;
- 25 (7) accacacacacaaggcuacuucccugau;
- (8) acagccgccuagcauuucaucac;
- (9) ggauggugcuucaagcuaguaccaguu。

本发明通过同源比较，获得一系列在所有已发表 HIV 病毒株间特别保守的核酸序列，该 RNA 序列导入细胞后，可以导致特异 mRNA 降解，从而降低 HIV 基因表达并导致 30 基因组降解。使用该序列研制的治疗药物可以大大减小因病毒基因突变带来的抗药性问

题。

所述 RNA 序列及其片段在其 5' 端或 3' 端加有核苷酸修饰。常见的修饰如在合成 RNA 的 3 端加 UU, 以利于正确配对。

一组 HIV 病毒感染及防治艾滋病的 RNA 序列, 该序列及其片段为所述的单链 RNA 5 序列及其片段 (序列表中 SEQ ID No. 1~SEQ ID No. 9) 和与之互补的 RNA 序列及其片段加上中间非互补连接序列形成的发夹样 RNA 序列。发夹样双链具有干扰 RNA 的相同活性, 由于是一条 RNA 链配对而成, 因此尤其适用于细胞内表达干扰 RNA。

一组 HIV 病毒感染及防治艾滋病的 DNA 序列及其片段:

1) 该 DNA 序列及其片段与所述的单链 RNA 序列及其片段 (序列表中 SEQ ID 10 No. 1~SEQ ID No. 9) 、或该单链 RNA 序列及其片段与其互补序列及其片段杂交形成的双链 RNA 序列对应; 或

2) 该 DNA 序列及其片段与 1) 所述 RNA 序列及其片段在其 5' 端或 3' 端加有核苷酸修饰的序列对应; 或

3) 该 DNA 序列及其片段与所述的单链 RNA 序列及其片段 (序列表中 SEQ ID 15 No. 1~SEQ ID No. 9) 和与之互补的 RNA 序列及其片段加上中间非互补连接序列形成的发夹样 RNA 序列、所述的单链 RNA 序列及其片段 (序列表中 SEQ ID No. 1~SEQ ID No. 9) 和与之互补的 RNA 序列及其片段杂交形成的双链 RNA 序列加上中间非互补连接序列形成的发夹样 RNA 序列对应。

一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的表达载体, 该载体整合有以上所述的 RNA 20 或 DNA 序列及其片段, 包括 DNA 载体和 RNA 载体。这些序列及其片段构建到合适的表达载体中、加入合适的调控序列并导入细胞后可表达干扰 RNA。表达载体包括 RNA 表达载体和 DNA 表达载体。RNA 表达载体如逆转录病毒载体, DNA 表达载体是指携带有所述 DNA 序列和其他表达调控序列的质粒载体、病毒载体等, 如腺病毒伴随病毒 (AAV)。

25 一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的脂质体, 该脂质体包裹有以上所述的 RNA 或 DNA 序列及其片段、或包裹有以上所述的抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的表达载体。使用该类脂质体可以将干扰 RNA 或可表达干扰 RNA 的质粒载体导入细胞。

一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的方法, 该方法是将以上所述的 RNA 或 DNA 序列及其片段、或表达载体、或脂质体在体内或体外导入真核细胞系、动物细胞及 30 人体。例如通过脂质体导入的方法、通过病毒载体导入的方法。

一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的核苷酸序列的应用, 将以上所述的 RNA 或

DNA 序列及其片段、或表达载体、或脂质体、或方法应用于制备抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的诊断、治疗和预防的药物。

附图说明

5 图 1 为报告质粒 pEGFP-gp120 的构建图。

图 2 为通过荧光显微镜检测的双链干扰 RNA 可以降低 EGFP-HIV gp120 融合蛋白的表达图。

图 3 为通过 Western-Blot 检测的双链干扰 RNA 可以降低 EGFP-HIV gp120 融合蛋白的表达图。

10 图 4 为表达内部双链 RNA 的质粒 p-H1-gp120i 的构建图。

图 5 为质粒 pAAV-120i 的构建图。

图 6 为通过荧光显微镜检测的携带可转录 HIV gp120 发夹样双链 RNA 的重组 AAV 病毒可抑制 GFP-GP120 融合蛋白的表达图。

15 实施发明的最佳方式

实施例中采用的方法均为本领域常规操作，详见《分子克隆》第三版。

实施例 1：极度保守 HIV RNA 序列的获得

选择已经发表的 HIV1 典型序列，按功能基因分成每个约 70 个核苷酸 (nt) 的片段；每一个片段用 NIH (美国国立卫生研究院) 提供的 BLAST 软件 (BLASTN 2. 2. 4/2. 2. 5) 20 在英特网上分析其在 GenBank (NCBI, 美国国家生物技术信息中心), EMBL (欧洲分子生物学实验室核酸序列数据库), DDBJ (日本 DNA 数据库) 及 GDB (基因组数据库) 不少于 14 万个核苷酸序列中的同源序列；选择出符合以下条件的核苷酸序列：(1) 该片段大于或等于 19 个核苷酸；(2) 该片段在所比较的 HIV 序列中完全同源或至少有 1000 个以上公开序列中该片段完全同源；(3) 不完全同源时，相应序列与该片段仅一个 nt 25 不同。所获得的序列见表 1，比较结果详见表 2。

表 1. 通过同源比较发现的 HIV 序列中极度保守的 RNA 序列

编号	HIV 基因	RNA 序列
1	gag-pol	aucaauggaggaagcugcagaauagg
2	gag-pol	gggaagugacauagcaggaacuacuag
3	gag-pol	uaaaauaaaaauaguagaauauguauagccu

编号	HIV 基因	RNA 序列
4	env	uaugggguaccugugugga
5	env	gccaaauucccauacauuaugugc
6	env	uuaaauggcagucuagcagaa
7	nef	accacacacaaggcuaciuuccugau
8	3-UTR	acagccgccuagcauuucaucac
9	LTR	ggauggugcuucaagcuaguaccaguu

表2. 极度保守 RNA 序列的同源比较结果

编号	HIV 基因	片段大小 (nt)	同源比较 的 HIV 序列数	完全同源 序列数	相 差 一 个 nt 序 列 数
1	gag-pol	24	1050	1050	0
2	gag-pol	27	1051	1050	1
3	gag-pol	29	1050	1048	2
4	env	19	1050	1050	0
5	env	24	1050	1050	0
6	env	21	1050	1050	0
7	nef	26	1082	1082	0
8	3-UTR	23	1070	1070	0
9	LTR	27	1069	1069	0

5 实施例 2. 使用合成 RNA 双链, 降低 HIV env 基因的表达。

根据上述 env 基因的保守序列 (表 1 中 4 号序列) 19 核苷酸的 RNA 片断, 并根据互补原则合成该链的互补 RNA 链, 在 RNA 链 3' 端加 UU 修饰:

5' uaugggguaccuguguggauu

3' uuauuaccccauggacacaccu

10 如图 1 所示, 质粒 pEGFPC1 (Clontech, CA) 用 EcoRI 和 BamHI 双酶切 (37°C 1 小时) 后回收大片断作为载体; 以 HIV-1 Bru 株 cDNA (2ng) 为模板, 加 gp120 引

物 1 (5' cggaattctaaagagcacaaga cagtggac)；和 引 物 2 (5' cggatcctactctaccgtcagcgtcattga) 各 100ng, Pfu 高保真酶 2.5 单位, dNTP 250 μ mol/L, 2.5mmol/L MgCl₂, 25mmol/L TrisHCl (pH8.3) 进行 PCR 反应 (94°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 90 秒, 使用 Perkin Elmer 9700 型 PCR 仪, 共 30 循环), PCR 5 产物用 Qiagen Gel Extraction Kit (购自 Biolab) EcoRI 和 BamHI 酶切后与上述载体连接后转化大肠杆菌 JM109 (购自 Promega), 获得完全正确的质粒 pEGFP-gp120, 该质粒转染细胞后可表达绿色荧光蛋白与 HIV gp120 的融合蛋白。

质粒 pEGFP-gp120 1 μ g 和 1 μ g 上述合成的 RNA 双链, 使用 LIPOFECTamine 法 (见 Invitrogen 说明书) 共转染 HEK293 细胞 (购自 ATCC), 36 小时后与加 1 μ g 无关双 10 链 (使用实施例 3 中的 GAG 双链作为无关双链) RNA 的共转染细胞用荧光照相法比较绿色荧光蛋白-GP120 融合蛋白的表达量, 并可通过使用抗 GFP 抗体 (购自 Clontech) 进行免疫印迹 (IB), 比较融合蛋白的表达产量。

结果: 如图 2 所示, 与对照比较, env 基因特异的双链 RNA 使融合蛋白的表达 15 产量显著降低; 重复该实验两次, 分别以 DsRNA1 和 DsRNA2 表示, 如图 3 所示, 该 dsRNA 能降低 GFP-HIV GP120 融合蛋白的表达产量 80% 以上。

实施例 3、合成 RNA 双链抑制 gag 基因表达

根据上述 gag 保守序列 (表 1 中 2 号序列) 合成 19 核苷酸的 RNA 片断, 并根据互补原则合成该链的互补 RNA 链, 在互补 RNA 链 3' 端加 UU, 退火后形成 RNA 双链:

20 5' gugacauagcaggaacuacuu
3' uucacuguaucguccuugaug

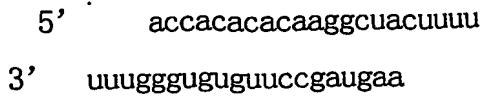
按照实施例 2 的方法, 通过 PCR 从 HIV (LAV-1, Bru 分离株) cDNA 扩增出 GAG 基因, 克隆至 pEGFP C1 质粒 (Clontech, CA), 该质粒转染细胞后可表达绿色荧光蛋白与 HIV gag 的融合蛋白。

25 所获得质粒与 RNA 双链, 使用 LIPOFECTamine 法共转染 HEK293 细胞, 36 小时后与不加双链 RNA 的转染细胞通过荧光显微镜观察比较绿色荧光蛋白-GAG 融合蛋白的表达量, 发现该 RNA 可使融合蛋白的表达产量显著降低。

实施例 4. 合成双链 RNA 抑制 nef 基因表达

30 根据 nef 保守序列 (表 1 中的 7 号序列), 合成 19 核苷酸的 RNA 片断, 并根据互补原

则合成该链的互补 RNA 链, 在互补 RNA 链 3' 端加 UU, 退火后形成 RNA 双链:



按照实施例 2 的方法, 通过 PCR 从 HIV (LAV-1, Bru 分离株) cDNA 扩增出 nef 基因, 克隆至 pEGFP C1 质粒 (Clontech, CA), 该质粒转染细胞后可表达绿色荧光蛋白与 HIV NEF 的融合蛋白。

所获得质粒与 RNA 双链使用 LIPOFECTamine 法共转染 HEK293 细胞, 36 小时后与不加双链 RNA 的转染细胞通过荧光显微镜观察比较绿色荧光蛋白-NEF 融合蛋白的表达量, 发现该 RNA 可使融合蛋白的表达产量显著降低。

10

实施例 5. 使用合成双链 RNA 降低其他 HIV 蛋白的产量

按照实施例 2 所述的方法使用合成双链 RNA 降低相应 HIV 蛋白的产量, 结果见表 3。

表 3 使用新型双链核糖核酸抑制 HIV 其它基因表达的效率

编号	DsRNA	HIV 靶基因	抑制率
1	5' aucaauggaaggcugcaguu 3' uuuaguuacuccuucgacguc	gag-pol	++++
2	5' guaagaaugucuagccuguu 3' uucauuuuacagauccggac	gag-pol	+++
3	5' uuccccauacauuuauugugcuu 3' uuaaggguauuguaauaacacg	env	+++
4	5' aaauggcagucuagcagaauu 3' uuuuuaccgucagauccgucuu	env	+++

15 注: + + + 抑制 60~80%; + + + + 抑制 80~100%.

实施例 6、合成含有 env 基因保守序列对应的 DNA 片段及其杂交序列, 克隆至真核表达载体, 在细胞内表达干扰 RNA, 抑制 HIV 膜蛋白的表达

合成含有 env 基因保守序列 (表 1 中 5 号序列) 对应的 DNA 片段及其杂交序列 (黑斜体) 的 DNA 片断, 退火后形成 DNA 片段, 5' 端为 BamHI 位点的末端, 3' 端为 HindIII 位点的末端, 在同源序列及其互补序列中间含有间隔序列。B 为 A 的

互补序列：

A: 5' gatcccc **ttcccatacattattgtgcttcaagagagcacaataatgtatggaaat**tttggaaa

B: 5' agttttccaaaaa **ttcccatacattattgtgctcttgaagcacaataatgtatggaa**ggg

如图 4 所示，通过 PCR (以人基因组 DNA 1 μ g 为模板，引物 1
5' 5'-TAATTAATGCGGCCGCAATTGAAACGCTGACGTC-3'，引物 2 5'-GCACTAGTAAGCT
TGGATCCG TGGTCTCATACAGAACTTATAAGATTCCC-3'，扩增条件同实施例 2) 获得人 H1 RNA
基因的启动子区，质粒 pEGFPC1 (Clontech) 用 AseI 和 XbaI 酶切后回收大片段作为
载体，上述扩增片段用 AseI 和 SpeI 酶切后回收，与载体连接，转化大肠杆菌后获
得质粒 pH1。将上述合成的 DNA 片段 (A, B) 退火后克隆至 pH1 质粒的 BamHI 和 HindIII
10 位点，构建质粒 pH1-gp120i。该质粒在细胞中，在 RNA 聚合酶 III 的作用下，表达
发夹状 RNA，形成 RNA 双链。

用 4 μ g pH1-gp120i 质粒 (使用同量 pH1 质粒作为对照) 与表达 EGFP-HIV GP120
融合蛋白的质粒共转染 HEK293 细胞，通过如实施例 2 所述方法比较融合蛋白的表
达产量的差异，结果表明 EGFP-gp120 融合蛋白的表达产量有显著降低；该结果说
15 明使用质粒载体携带编码上述 RNA 的 DNA 序列可以有效抑制 HIV 靶基因的表达。

实施例 7. 使用腺病毒伴随病毒载体，携带如实施例 6 中所述的 H1 启动子及编码发
夹状双链 RNA 的 DNA 片段，重组病毒感染细胞后抑制 HIV GP120 基因的表达。

如图 5 所示，质粒 pAAV-MCS (购于 Stratagene) 用 NotI 和 HindIII 酶切；含
20 H1 启动子和编码 gp120 的发夹状 RNA 的 DNA 片段从质粒 pH1-gp120i 中用 NotI 和
HindII 酶切获得，并克隆至 pAAV-MCS 的相应位点。构建质粒 pAAV-gp120i，将该
质粒 (4 μ g) (对照病毒载体用 pAAV-MCS) 与辅助质粒 pHelper (1 μ g, Stratagene) 和
质粒 pAAV-RC (2 μ g Stratagene) 一起用 LIPOFECTamine 法共转染 HEK 293FT 细胞，
48 小时后取上清制备“重组 AAV 病毒”及对照病毒；将 pEGFP-GP120 (1 μ g) 的质
25 粒转染 HEK293 细胞，然后加入上述含重组病毒的制备上清，24 小时后用荧光显微
镜分析细胞内 GFP 发光强度。

结果如图 6 所示，表明携带可转录 HIV gp120 发夹状双链 RNA 的重组 AAV 病
毒可使 GFP-GP120 融合蛋白表达水平显著降低。

本发明与现有技术相比具有明显的优势：

通过同源比较，获得一系列与所有已经发表的 HIV 序列高度同源的 RNA 序列片段，使用该系列片段衍生的双链 RNA 序列可以有效地抑制 HIV 基因的表达；使用质粒转录的该系列 RNA 也可在细胞内抑制 HIV 基因的表达；携带该片段对 5 应 DNA 腺病毒伴随病毒感染细胞后可以转录出对应的双链 RNA 并抑制 HIV 基因的表达。

权利要求

1、一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的 RNA 序列及其片段，其特征在于：该序列及其片段为如下所述的单链 RNA 序列及其片段、或该单链 RNA 序列及其片段与其互补序列及 5 其片段杂交形成的双链 RNA 序列：

- (1) aucaaugaggaagcugcagaaugg;
- (2) gggaaugugacauagcaggaacuacuag;
- (3) uaaaaaaaauaguaagaauguauagccu;
- (4) uaugggguaccugugugga;
- 10 (5) gccaaauucccauacauuuauugugc;
- (6) uuaaauggcagucuagcagaa;
- (7) accacacacaaggcuacuuuccugau;
- (8) acagccgccuagcauuucaucac;
- (9) ggauggugcuaagcuaguaccaguu。

15 2、根据权利要求 1 所述的一组抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的 RNA 序列及其片段，其特征在于：所述 RNA 序列及其片段在其 5' 端或 3' 端加有核苷酸修饰。

3、一组抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的 RNA 序列，其特征在于：该序列及其片段权利要求 1 所述的单链 RNA 序列及其片段和与之互补的 RNA 序列及其片段加上中间非互补连接序列形成的发夹样 RNA 序列。

20 4、一组抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的 DNA 序列及其片段，其特征在于：

1) 该 DNA 序列及其片段与权利要求 1 所述的单链 RNA 序列及其片段、或该单链 RNA 序列及其片段与其互补序列及其片段杂交形成的双链 RNA 序列对应；或
2) 该 DNA 序列及其片段与 1) 所述 RNA 序列及其片段在其 5' 端或 3' 端加有核苷酸修饰的序列对应；或

25 3) 该 DNA 序列及其片段与权利要求 1 所述的单链 RNA 序列及其片段和与之互补的 RNA 序列及其片段加上中间非互补连接序列形成的发夹样 RNA 序列、或权利要求 1 所述的单链 RNA 序列及其片段和与之互补的 RNA 序列及其片段杂交形成的双链 RNA 序列加上中间非互补连接序列形成的发夹样 RNA 序列对应。

30 5、一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的表达载体，其特征在于：该载体整合有权利要求 1 至 4 中任何一项所述的 RNA 或 DNA 序列及其片段，包括 DNA 载体和 RNA 载体。

6、一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的脂质体，其特征在于：该脂质体包裹有权利要求 1 至 4 中任何一项所述的 RNA 或 DNA 序列及其片段、或包裹有权利要求 5 所述的抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的表达载体。

7、一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的方法，其特征在于：该方法是将权利要求 1 至 4 中任何一项所述的 RNA 或 DNA 序列及其片段、或权利要求 5 所述的表达载体、或权利要求 6 所述的脂质体在体内或体外导入真核细胞系、动物细胞及人体。

8、一种抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的核苷酸序列的应用，其特征在于：将权利要求 1 至 4 中任何一项所述的 RNA 或 DNA 序列及其片段、或权利要求 5 所述的表达载体、或权利要求 6 所述的脂质体、或权利要求 7 所述的方法应用于制备抗 HIV 病毒感染及防治艾滋病的诊断、治疗和预防的药物。

1/6

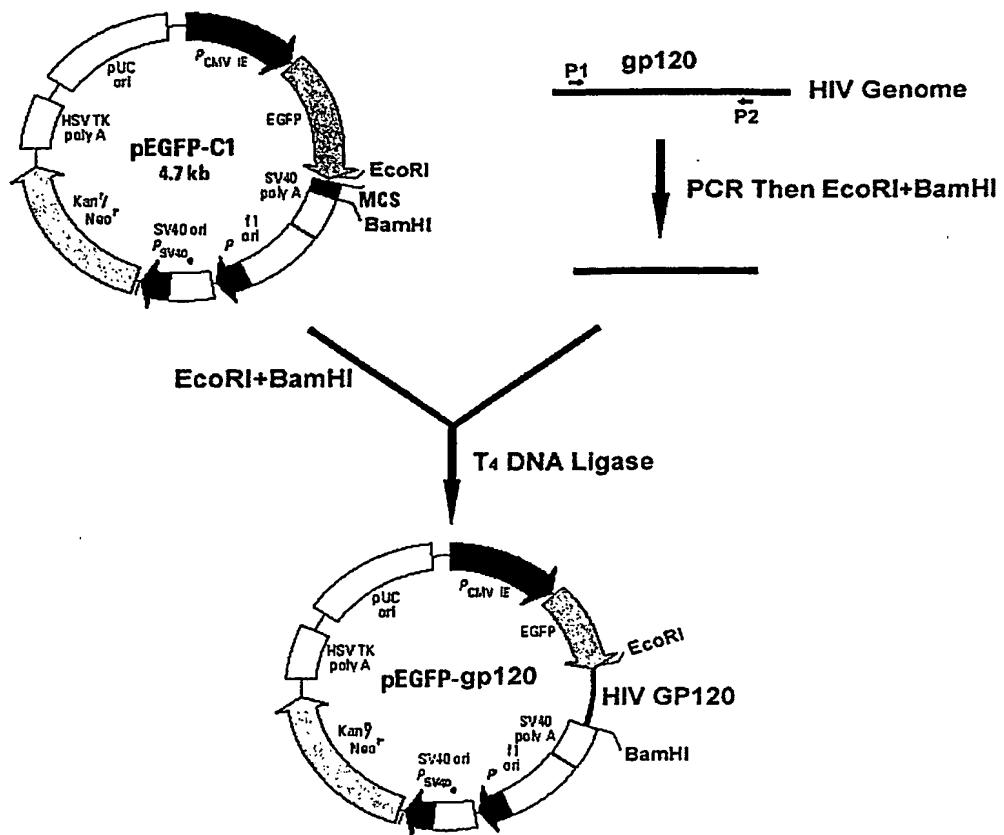
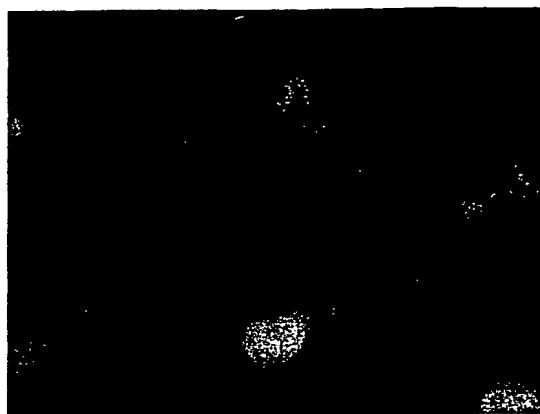
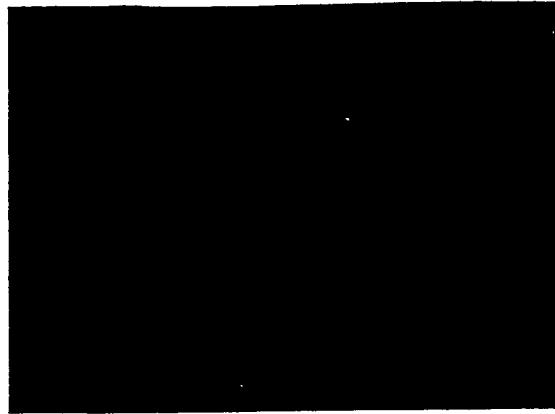


FIG 1



对照



+DsRNA

FIG 2



FIG 3

4/6

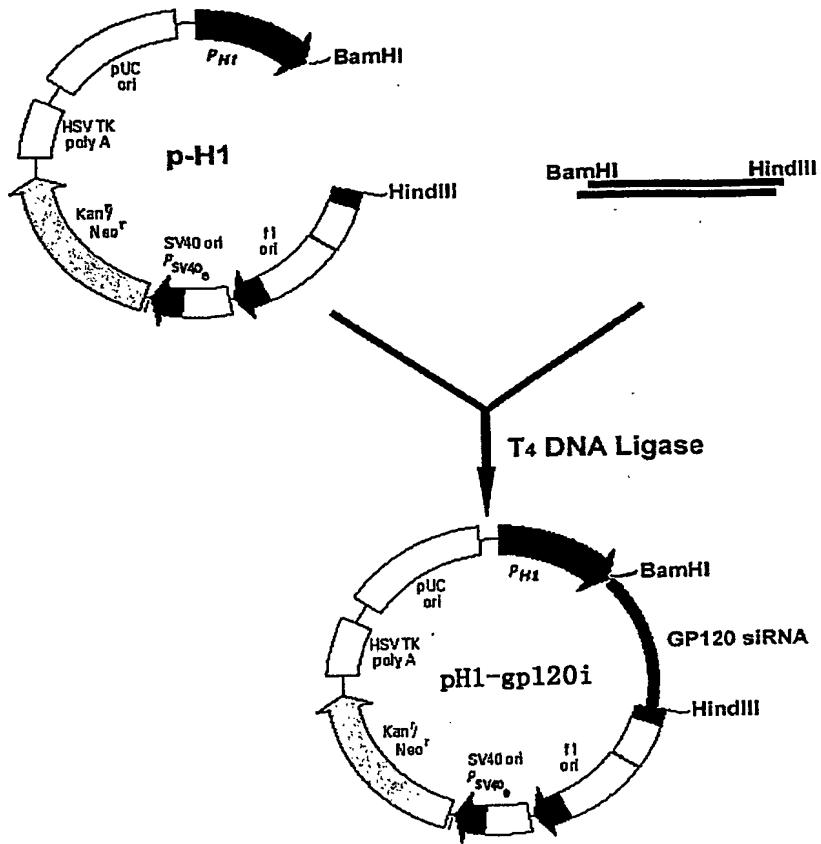


FIG 4

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/055035

PCT/CN2003/001068

5/6

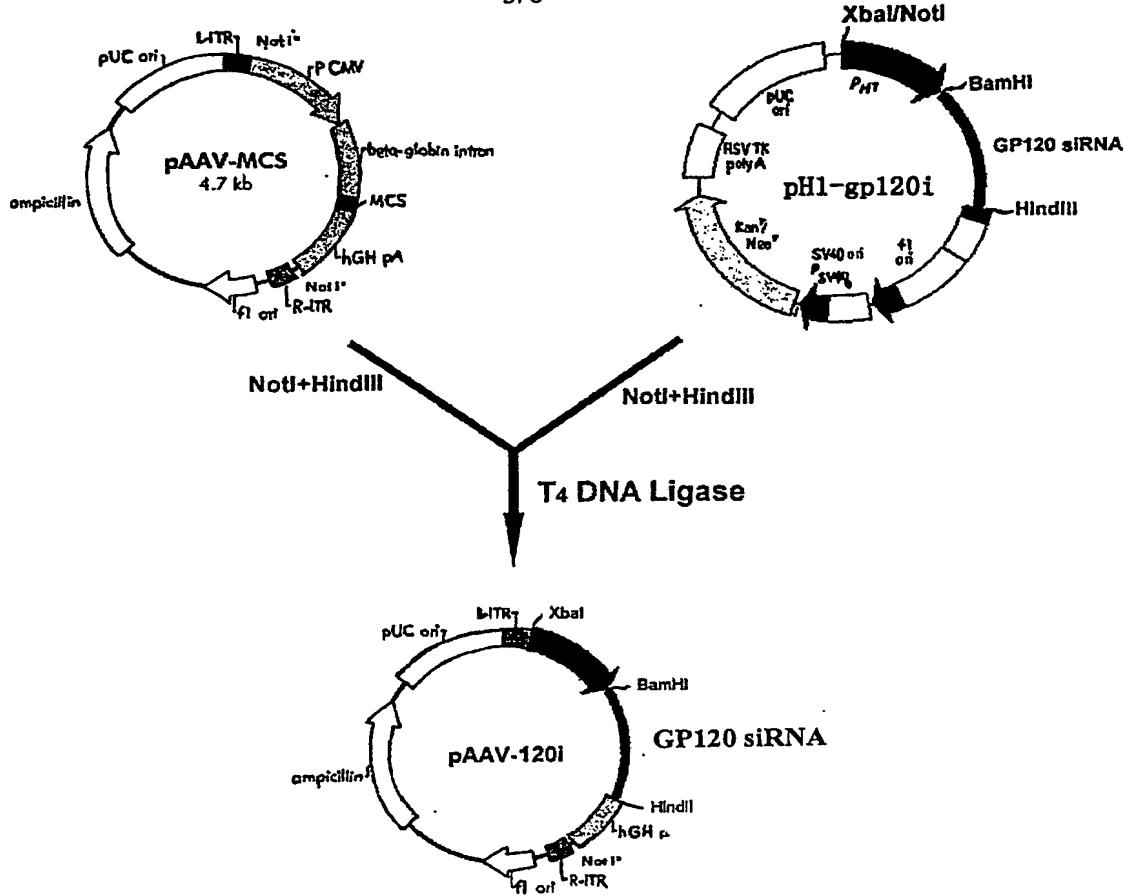


FIG 5

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/055035

PCT/CN2003/001068

6/6

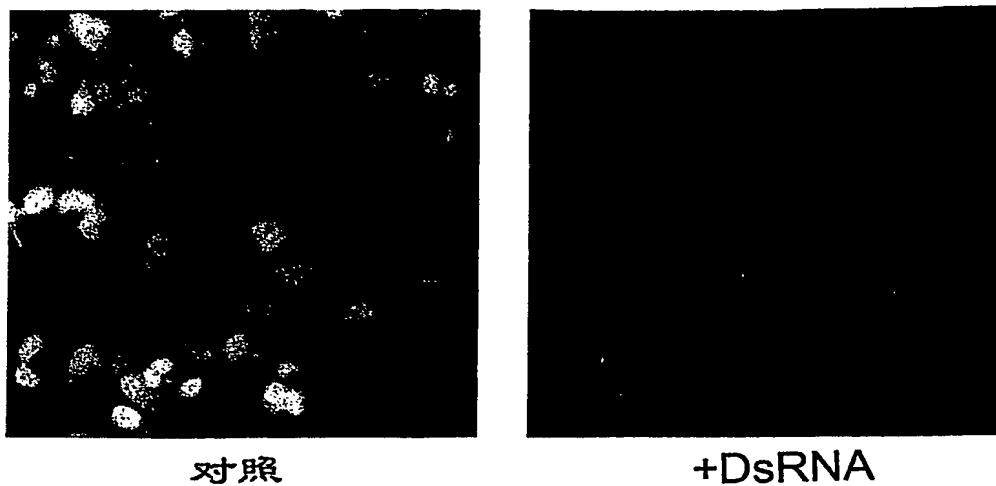


FIG 6

序列表

<110> 北京昭衍新药研究中心

<120> 一组抗 HIV 感染及防治艾滋病的核苷酸序列及其应用

5 <130>

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

10 <211> 24

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 1

15 aucaauggagg aagcugcaga augg 24

<210> 2

<211> 27

<212> RNA

20 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 2

gggaagugac auagcagggaa cuacuag 27

<210> 3

25 <211> 29

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 3

30 uaaaaaaaaau aguaagaaug uauagccu 29

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

5

<400> 4

uauggggguac cugugugga 19

<210> 5

10 <211> 24

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 5

15 gccaaauuccc auacauuuuu gugc 24

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

20 <213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 6

uuaaaauggca gucuagcaga a 21

25 <210> 7

<211> 26

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 7

30 accacacacaca aggcuacuuc ccugau 26

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

5

<400> 8

acagccgccc agcauuucau cac 23

<210> 9

10 <211> 27

<212> RNA

<213> 慢病毒属 (*Lentivirus genera*)

<400> 9

15 ggauggugcu ucaagcuagu accaguu 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/01068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C07H21/00,C12N15/63,15/88;A61P31/18,A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED IPC⁷ C07H,C12N,A61P,A61K

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,EPODOC,CNPAT,PAJ,CA,GENBANK,EMBL,DDBJ,SwissProt

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF VIROLOGY, Vol.76 No.18, Sept.2002, 9225-9231, Glen A. et al. "Potent and Specific Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by RNA Interference" See the whole document	1-6,8
A	Nature biotechnology, Vol.20, May, 2002, 500-505. Nan Sook Lee et al. "Expression of small Interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts In human cells" See the whole document	1-6,8
A	US 6436634 B1(Holzmayer et al.) 20.Aug.2002(20.08.02), the whole document	1-6,8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11.Mar.2004(11.03.04)	Date of mailing of the international search report 25 · MAR 2004 (25 · 03 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer  Telephone No. 86-10-62085074

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/01068

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
method for the diagnosis and treatment of diseases
2. Claims Nos:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/01068

US6436634B1	20.08.02	WO9854366	A	03.12.1998
		AU7813398	A	03.12.1998
		US6071743	A	06.06.2000
		EP1015630	A	05.07.2000
		US6326152	B	04.12.2001
		AU745745	B	28.03.2002
		JP2002512522T	T	23.04.2002
		US6436634	B	20.08.2002

A. 主题的分类

IPC⁷ C07H21/00, C12N15/63, 15/88; A61P31/18, A61K48/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域 IPC⁷ C07H, C12N, A61P, A61K

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPODOC, CNPAT, PAJ, CA, GENBANK, EMBL, DDBJ, SwissProt

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	JOURNAL OF VIROLOGY, 第 76 卷第 18 期, 2002 年 9 月出版, Glen A. 等, "Potent and Specific Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by RNA Interference" 第 9225-9231 页	1-6, 8
A	Nature biotechnology, 第 20 卷, 2002 年 5 月出版, Nan Sook Lee 等, "Expression of small Interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts In human cells" 第 500-505 页	1-6, 8
A	US ,B1,6436634 2002 年 8 月 20 日(20.08.02), 全文	1-6, 8

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

"A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

"L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

"+"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

11.03 月 2004 (11.03.04)

国际检索报告邮寄日期

25.3月 2004 (25.03.2004)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员



电话号码: 86-10-62085074

第I栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第 1 页第 1 项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求 (编号) : 7

因为它们涉及到不要求本国际检索单位检索的主题, 即:
疾病的诊断和治疗方法

2. 权利要求 (编号) :

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以至于不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. 权利要求 (编号) :

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第 1 页第 2 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. 由于申请人按时缴纳了所要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求都进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分所要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求 (编号) :

4. 申请人未按时缴纳所要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首先提到的发明;
包含该发明的权利要求是 (编号) :

关于异议的说明: 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

支付附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT / CN03 / 01068

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利成员		公布日期
US6436634B1	20.08.02	--WO9854366--	A	03.12.1998
		--AU7813398--	A	03.12.1998
		--US6071743--	A	06.06.2000
		--EP1015630--	A	05.07.2000
		--US6326152--	B	04.12.2001
		--AU745745--	B	28.03.2002
		--JP2002512522T-- T		23.04.2002
		--US6436634--	B	20.08.2002

ABSTRACT

The invention provides a set of nucleotides against HIV infection and their application for treatment and prevention of AIDS. The sequences of the nucleotides were shown in the sequences table. The invention was superior to the similar technology as following: High conserved RNA sequences were obtained by compare all the published HIV genome sequences. Double strand RNA sequences derived from the sequences can effectively inhibit the expression of target HIV gene. HIV gene expression can also be inhibited by double strand hairpin-like RNA transcribed in the cells harboring recombinant plasmid which contain the DNA sequences encoding the RNA sequences. Further, HIV gene expression can be knocked down by in cell transcribed double strand RNA corresponding to the RNA sequences encoded by recombinant adenovirus associated virus.

20

25

30